

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-059956

(43)Date of publication of application : 03.03.1998

(51)Int.Cl.

C07D311/36
A23L 3/3544
A61K 31/35
A61K 31/35
A61K 31/35
A61K 31/35
C09K 15/06
C12P 17/06
//(C12P 17/06
C12R 1:69)

(21)Application number : 08-238636

(71)Applicant : KIKKOMAN CORP

(22)Date of filing : 22.08.1996

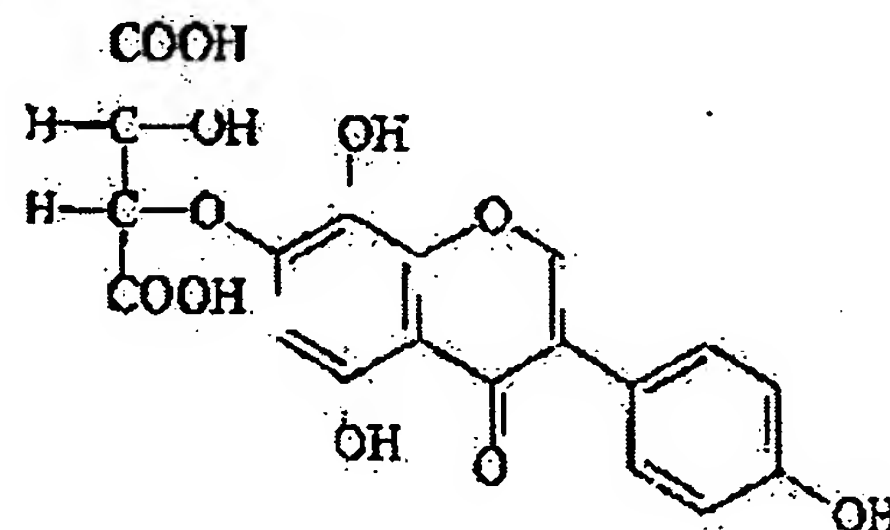
(72)Inventor : KINOSHITA EMIKO
OZAWA YOSHINORI
AIJIMA TETSURO

(54) NEW ISOFLAVONE DERIVATIVE AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new isoflavone derivative having excellent inhibiting activities against a histidine decarboxylase and antioxidant activities and useful for a medicine, an antioxidant, a functional food, etc.

SOLUTION: This new isoflavone derivative is represented by the formula or its salt. The isoflavone derivative is obtained by culturing a microorganism having an ability for producing the isoflavone derivative (especially, *Aspergillus oryzae*) in a culturing medium and collecting the isoflavone derivative from the obtained cultured material. Further, one or more kind materials selected from daidzein, genistein, daizin, genistin, etc., is preferably added to the culturing medium or the culturing material. The compound of the formula has a high safety as a medicine and no side effect and useful for a remedy for an inflammatory disease.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-59956

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月3日

(51) IntCl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 311/36			C 0 7 D 311/36	
A 2 3 L 3/3544			A 2 3 L 3/3544	
A 6 1 K 31/35	ABF		A 6 1 K 31/35	ABF
	ACD			ACD
	ACL			ACL
審査請求 未請求 請求項の数7 FD (全 7 頁) 最終頁に続く				

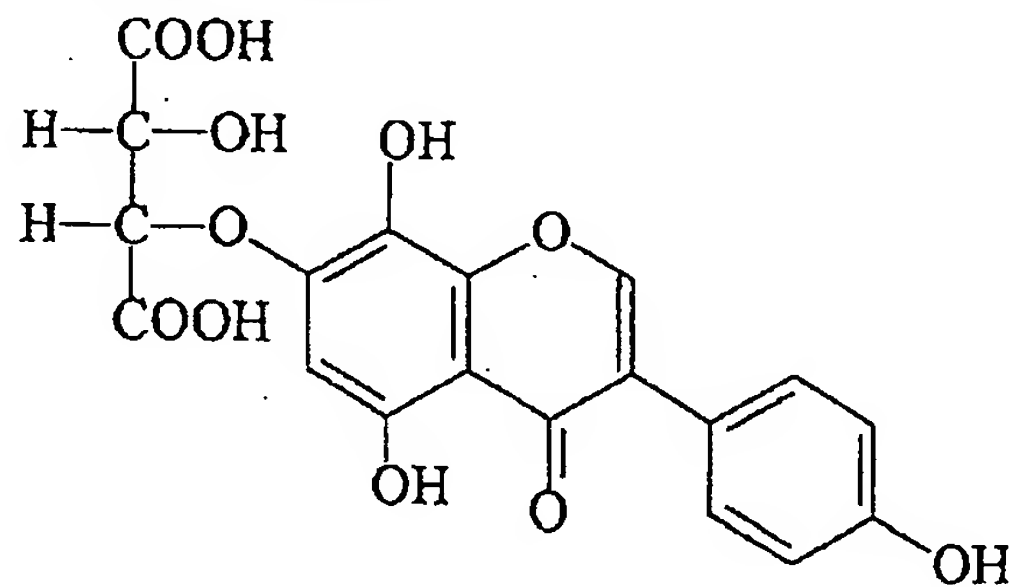
(21) 出願番号	特願平8-238636	(71) 出願人	000004477 キッコーマン株式会社 千葉県野田市野田339番地
(22) 出願日	平成8年(1996) 8月22日	(72) 発明者	木下 恵美子 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内
		(72) 発明者	小澤 善徳 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内
		(72) 発明者	相島 鐵郎 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内

(54) 【発明の名称】 新規イソフラボン誘導体及びその製造法

(57) 【要約】

【化1】

【解決手段】 次式のイソフラボン誘導体またはその塩



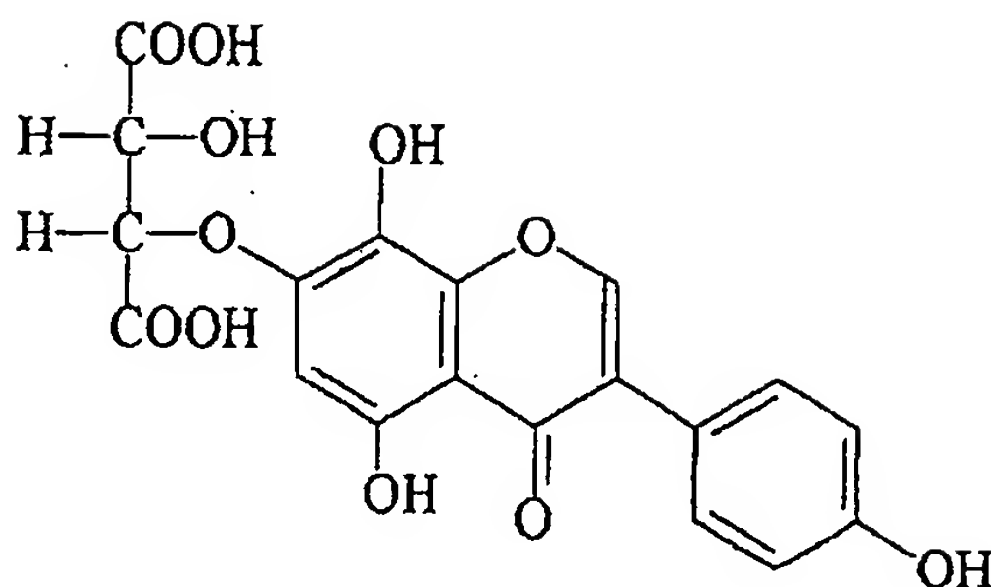
【効果】 本発明のイソフラボン誘導体は、潰瘍、アレルギー疾患等の炎症疾患の原因となるヒスタミンの生合成に関与するヒスチジン脱炭酸酵素に対し優れた活性阻

害作用を示し、副作用もない。また、本物質は、優れた抗酸化活性をも有している。本物質は、医薬、抗酸化剤、機能性食品等として大変有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の一般式：

【化1】



で表される新規イソフラボン誘導体またはその塩。

【請求項2】 請求項1記載のイソフラボン誘導体またはその塩を有効成分として含有する医薬。

【請求項3】 請求項1記載のイソフラボン誘導体またはその塩を有効成分として含有するヒスチジン脱炭酸酵素阻害剤。

【請求項4】 請求項1記載のイソフラボン誘導体またはその塩を有効成分として含有する抗酸化剤。

【請求項5】 請求項1記載のイソフラボン誘導体の生産能を有する微生物を培地に培養し、得られる培養物から該イソフラボン誘導体採取することを特徴とするイソフラボン誘導体の製造法。

【請求項6】 請求項1記載のイソフラボン誘導体の生産能を有する微生物を培地に培養し、得られる培養物から該イソフラボン誘導体採取するにあたり、培地または培養物に、ダイゼイン、ゲニステイン、ダイジン、ゲニスチン、トランス-エポキシコハク酸より選ばれた一種以上の物質を添加することを特徴とするイソフラボン誘導体の製造方法。

【請求項7】 微生物が、*Aspergillus oryzae*である請求項5または6記載のイソフラボン誘導体の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒスチジン脱炭酸酵素阻害活性等の薬効及び抗酸化活性を有する新規イソフラボン誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】胃潰瘍、十二指腸潰瘍等の潰瘍、喘息性気管支炎、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患は、生

体内の過剰なヒスタミンの生成により起こる炎症疾患である。ヒスタミンは、ヒスチジンの脱炭酸反応により生成する。この反応を触媒する酵素がヒスチジン脱炭酸酵素（以下、「HDC」という）である。

【0003】上記の炎症疾患の治療薬としては、ヒスタミンの生合成を阻害するもの、すなわちHDC阻害剤が知られている。このような薬剤としては、（+）-カテキン、ヒスチジン誘導体、シアニダノール、トリトクアリン等を挙げることができる。一方、抗酸化剤は、各種工業製品及びその製造原料に添加して用いる添加剤として、また、その抗酸化活性を利用する医薬・機能性食品・化粧品等として広く用いられている。このため、優れた抗酸化剤の開発が、強く求められている。なお、本発明でいう抗酸化剤とは、

（1）食品、医薬、化粧品、化学薬品等の各種工業製品及びその製造原料に添加され、それらの酸化を防止し、安定性や保存性等を向上させるために用いられる添加物。

（2）生体内において抗酸化活性（例えば、フリーラジカル消去作用、脂質の過酸化防止作用、抗腫瘍作用等）を示す医薬あるいは機能性食品として、種々の疾患或いは皮膚障害等の予防・治療に用いられるもの。

（3）皮膚、粘膜、毛髪等の酸化を抑制するために用いる化粧品或いは皮膚外用剤。

等として用いることのできる薬剤を意味する。なお、本発明でいう医薬とは、薬事法上の医薬品及び医薬部外品を意味する。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、新規イソフラボン誘導体を有効成分として含有する優れた医薬を提

供することにある。

【0005】

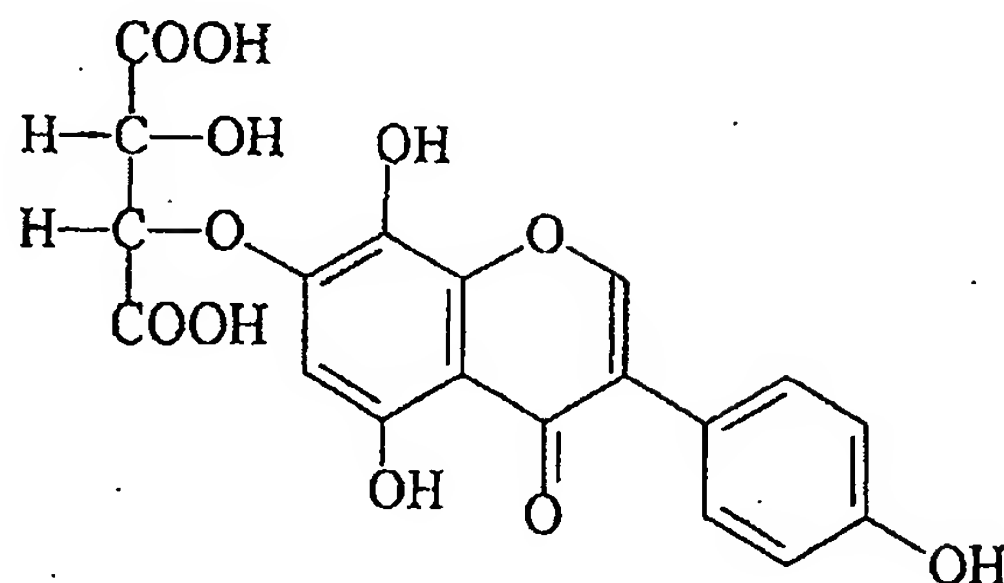
【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、下式で表される新規イソフラボン誘導体が、優れたHDC阻害活性及び抗

酸化活性を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記の一般式：

【0006】

【化2】



【0007】で表される新規イソフラボン誘導体またはその塩である。本発明のイソフラボン誘導体の塩とは、薬学的に許容されるものであればどのようなものでもよく、そのような塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アンモニウム、モノエタノールアミン等のアミン類との塩が挙げられる。さらには、該イソフラボン誘導体と、無機酸もしくは有機酸とを反応させることにより得られる塩を挙げることができる。ここでいう無機酸としては、例えば、塩酸、リン酸、硝酸等が挙げられ、有機酸としては、例えば、酢酸、コハク酸、マレイン酸等が挙げられる。本発明のイソフラボン誘導体の塩には、上述の塩の無水物及び水和物も含まれる。また、本発明は、新規イソフラボン誘導体またはその塩からなる医薬である。更に本発明は、本発明のイソフラボン誘導体の生産能を有する微生物を培地に培養し、得られる培養物から該イソフラボン誘導体を採取することを特徴とするイソフラボン誘導体の製造法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】

【本発明の実施の形態】本発明のイソフラボン誘導体（以下「本物質」という）を得るための出発材料は、本物質又はその前駆体を含有するものであればいかなるものでもよい。本物質は、例えば、本物質の生産能を有する微生物を培地に培養し、その培養物から本物質を採取することによって得られる。

【0009】本発明で用いられる微生物は、本物質の生産能を有するものであればいかなる菌株でもよいが、例えば、*Aspergillus*属に属する微生物、具体的には*Aspergillus oryzae* (IFO 4206)等を挙げることができる。又、本発明で用いられる微生物は、上記の菌株のみならず、人工的又は自然に得られる変異株であってもよい。上記の菌株の変異株を人工的に作成する方法としては、例えば、ラジオアイソトープ、紫外線、ニトロソグアニジン等を用いて原株に突然変異を起こさせる方法を用いることができる。

【0010】本発明で用いられる微生物を培養するための培地は、該微生物を培養する通常の培地、すなわち炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養素を適切な割合で含有し、且つ本物質の前駆体となり得る物質（以下「前駆物質」という）を含有するものであれば、合成培地又は天然培地のいずれでも使用できる。前駆物質としては、例えば、ダイゼイン、ゲニステイン、ダイジン、ゲニスチン、トランス-エポキシコハク酸等を挙げることができる。該前駆物質は、微生物の培養開始時または途中で培地に添加することもできるし、あるいは、培養後に得られる培養物に添加することもできる。なお、本発明でいう培養物には、培養物を水または適当な溶媒（各種緩衝液、有機溶媒等）で抽出して得た抽出物も含まれる。培地や培養物等に対する前駆物質の添加量は、特に限定されないが、トランス-エポキシコハク酸の場合ならば、培地等に対して10~10⁴ ppm程度添加すれ

ばよい。本発明で用いられる培地としては、例えば、蒸煮大豆及び炒熱後に粉碎した小麦の混合物、あるいは該混合物にトランス-エポキシコハク酸を添加したものを挙げることができる。該混合物を用いる場合、前駆物質であるダイゼイン、ゲニステイン、ダイジン、ゲニスチン等は、培地成分である大豆から供給される。微生物の培養は、25～35℃、好ましくは30℃前後で30～80時間、好ましくは40～45時間行えばよい。

【0011】以上の操作により、培養物中に本物質が生成蓄積する。なお、本物質の生成蓄積を促進するため、上記の培地にて本物質の前駆体となり得る物質を添加してもよい。そのような物質としては、例えば、ダイゼイン、ゲニステイン、ダイジン、ゲニスチン、トランス-エポキシコハク酸等を挙げることができる。培養終了後、培養物より本物質を精製するためには、溶媒抽出法、蒸留法、各種クロマトグラフィー等を含む通常の方法を用いることができる。本物質は、例えば、下記の方法を用いて精製することができる。

【0012】先ず、培養物に蒸留水を加えた後、35～45℃で一晩静置し、培養物より本物質を抽出する。次いで、培養物のガーゼ濾過及び遠心分離を行い、得られた遠心上清をフィルター濾過する。上記の遠心上清に、有機溶媒、例えば酢酸エチル、1-プロパノール等を加えて、振盪した後、上層と下層とに分ける。この上層について、上記と同様の有機溶媒処理を2回行い、下層を得る。得られた全ての下層を合わせ、塩酸でpH2.0前後に調整した後、有機溶媒を加えて、振盪し、上層と下層とに分ける。この上層をロータリーエバポレーター（東京理化社製）にて濃縮し、濃縮液を得る。

【0013】該濃縮液を、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（以下「逆相HPLC」という）に供する。逆相カラムとしては、Wakosil-115C18HG（和光純薬社製）、TSKgel ODS-120T（東ソー社製）等が挙げられる。吸着画分は、トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配により溶出させることができる。溶出液を分画した後、各画分のHDC阻害活性を後記の測定法に従って測定する。HDC阻害活性を有する画分を、ロータリーエバポレーターにより濃縮し、濃縮液を得る。該濃縮液を蒸留水、エタノール等に溶解した後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行ない、HDC阻害活性を有する画分を集める。ゲル濾過支持体としては、バイオゲルP-2樹脂（バイオラド社製）、トヨパールCW-35（東ソー社製）等が挙げられる。

【0014】以上の操作により、高度に精製された本物質を得ることができる。本物質は優れたHDC阻害活性及び抗酸化活性を有し、且つ高い安全性を示すことから、医薬、抗酸化剤、或いは機能性食品として有用である。本物質を医薬、例えば炎症疾患の治療薬等として用いる場合、単独で投与することもできるが、通常は、賦

形剤、潤沢剤、希釈剤、pH調製剤、防腐剤、甘味剤、芳香剤、乳化散剤等を用いて錠剤、粉剤、水和剤、乳剤、カプセル剤、注射剤、点滴剤、座剤等の形に製剤化し、経口的又は非経口的に投与することができる。上記賦形剤としては、水、ゼラチン、澱粉、結晶セルロース、ステアリン酸マグネシウム、ラクトース、アラビアゴム、植物油等が挙げられる。

【0015】本物質の投与量は、投与方法と症状の程度、患者の年齢、体重等により異なるが、通常、成人一日当たりの有効成分として0.01～20g、好ましくは0.05～10gの範囲で選ばれる。又、本物質を、他の医薬品等と適宜混合して使用することも可能である。本物質を機能性食品として用いる場合、そのまま、又は他の食品に添加して使用することができる。本物質を他の食品に添加する場合、食品中に混合する方法、食品表面に塗布する方法等が例示される。その場合は、食品1kg当たり0.01g以上、好ましくは、0.05～10g程度添加すればよい。

【0016】適用できる食品としては、醤油、味噌、つゆ等の調味料、カマボコ、チクワ等の水産練り製品、ハム、ソーセージ等の畜肉加工品、日本酒、洋酒、果実酒等の酒類、清涼飲料、果実飲料等の飲料類、ケーキ、プリン、饅頭等の菓子類が例示される。更に、本物質を、果実、野菜類、缶詰類、惣菜食品等に添加して用いることも可能である。

【0017】本物質は、他の食品添加物等と適宜混合して使用することも可能である。本物質のHDC阻害活性の測定法及び抗酸化活性の測定法を以下に示す。

1. HDC阻害活性の測定法

(1) 試薬

a. 酵素溶液

HDCを、マウス肥満腫瘍細胞P-815（Biochim. Biophys. Acta., 1133, 172-178（1992）参照）から、Ohmoriらの方法（J. Biochem., 107, 834-839（1990）参照）により部分精製したもの。

【0018】b. 基質溶液

リン酸緩衝液100mM

ヒスチジン5μg/ml

ビリドキサルリン酸5μg/ml

aの酵素溶液20μl/ml

c. 検体溶液

本物質の各精製工程において得られた画分

【0019】(2) 反応条件

基質溶液0.1mlに、検体溶液10μlを添加し、37℃で12時間反応させる。

【0020】(3) 反応生成物ヒスタミンの定量

生成したヒスタミンは、ジメチルアミノアゾベンゼンイソチオシアネート誘導体としてHPLCを用いて定量する。HPLCの条件は以下の通り。

a. カラム : Cosmosil 5SL (ナカライテスク社製)

b. 溶出液 : クロロホルム/ジメチルホルムアミド/水/酢酸=210/80/4/1 (vol./vol.)

c. 検出波長: 435 nm

【0021】(4) HDC阻害活性の算出

HDC阻害率の算出方法は、以下の通りである。

阻害率 (%) = $(1 - A/B) \times 100$

A: 基質溶液に、検体溶液を添加して反応させたときのヒスタミン生成量

B: 検体溶液の代わりに、メタノール10 μ lを添加し、同様の条件で反応させたときのヒスタミン生成量

2. 抗酸化活性の測定

方法: AMVN (2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)によるメチルリノレートの酸化反応系に本物質を添加し、本物質が酸化反応に及ぼす影響を検討する。

(1) 反応溶液

100 mM メチルリノレート

n-ヘキサン-イソプロパノール (7:3, v/v)

10 mM AMVN

本物質 (0.1 mM, 0.5 mM)

(2) 酸化反応

上記の反応溶液を、37℃の暗室中で振とうし、生成するメチルリノレートヒドロパーオキシド (MeL-OOH) を、HPLCを用いて経時的に分析する。

【0022】

【実施例】

【実施例1】

(1) 種菌の培養

Aspergillus oryzae (IFO4206) を、MA培地 (2.0%モルトエクストラクト、2.0%グルコース、0.1%ペプトン、2.0%寒天) を用いて斜面培養した。培養物1白金耳分を、水分含量80% w/v のフスマ5 gに植菌し、30℃で4日間培養し、得られた培養物を種菌とした。

【0023】(2) 本培養

本培養に用いる培地は下記の方法により調製した。すなわち、丸大豆300 gを12時間水に浸漬した後、4時間蒸煮した。得られた蒸煮大豆に、炒熱した後粉碎した小麦335 gを加えた。上記の培地に、種菌2 gを加えて混和し、30℃で1週間静置培養した。得られた培養物に蒸留水800 mlを加えた後、42℃で一晩静置し、次いで培養物のガーゼ濾過及び遠心分離 (7000 rpm) を行った。得られた遠心上清を0.8 μ mのフィルター (ミリポア社製) で濾過した後、0.45 μ mのボルトトップフィルター (ファルコン社製) で濾過した。

【0024】(3) 本物質の精製

上記の濾液500 mlに、酢酸エチル (和光純薬社製)

250 mlを加えて、3分間振盪した後、上層と下層とに分けた。この上層について上記と同様の酢酸エチル処理を2回行い、下層を得た。得られた下層を合わせ、塩酸でpH2に調整した後、酢酸エチル250 mlを加えて3分間振盪し、上層と下層とに分けた。得られた上層に酢酸エチル (和光純薬社製) 250 mlを加えて、3分間振盪し、上層と下層とに分けた。得られた上層をロータリーエバポレーター (東京理化学社製) にて濃縮し、濃縮液10 mlを得た。

【0025】該濃縮液を、プレカラム (カラム: Wakosil-II 5C18HG 10 \times 50 mm 和光純薬社製) を配置した逆相HPLC (カラム: Wakosil-II 5C18HG 10 \times 300 mm 和光純薬社製) に供した。吸着画分は、0.05%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配により溶出させた (図1)。溶出液を15 mlずつ分画し、HDC阻害を有する画分を集めた。高いHDC活性阻害作用を有するピークAについて、下記の方法を用いて更に精製した。すなわち、ピークAの画分をロータリーエバポレーターにて濃縮し、濃縮液3 mlを得た。該濃縮液を、1 Mの酢酸で平衡化したバイオゲルP-2樹脂 (バイオラド社製) を充填したカラム (20 \times 380 mm) に供してゲル濾過を行った。溶出液を15 mlずつ分画し、HDC阻害作用を有する区分を集めた。これをロータリーエバポレーターにて濃縮後、ピークAの精製標品約2.1 mgを得た。

【0026】(4) 構造解析

ピークAの物性を以下に示す。

性状: 淡黄色粉末

融点 (℃): 209~212℃ (分解)

分子量及び分子式: 418, C₁₉H₁₄O₁₁

マスマスペクトル: m/z 419 [M+H]⁺ (FAB-MS, JMX-LX2000, 日本電子社製)

IRスペクトル: KBr錠法, JASCO FT/IR-7300 (日本分光社製)

(cm⁻¹): 3450, 1650, 1640, 1620, 1540, 1520, 1510, 1460, 1420, 1220, 1100, 1050, 840

¹H-NMRスペクトル: DMSO-d₆ 中, 400 MHz, JOEL JNM-LA400 (日本電子社製)

δ (ppm): 4.63 (1H, d), 5.32 (1H, d), 6.42 (1H, s), 6.81 (2H, d), 7.39 (2H, d), 8.50 (1H, s), 8.72 (OH, br), 9.55 (OH, br), 12.31 (OH, br)

¹³C-NMRスペクトル: DMSO-d₆ 中, 100 MHz, JOEL JNM-LA400 (日本電子社製)

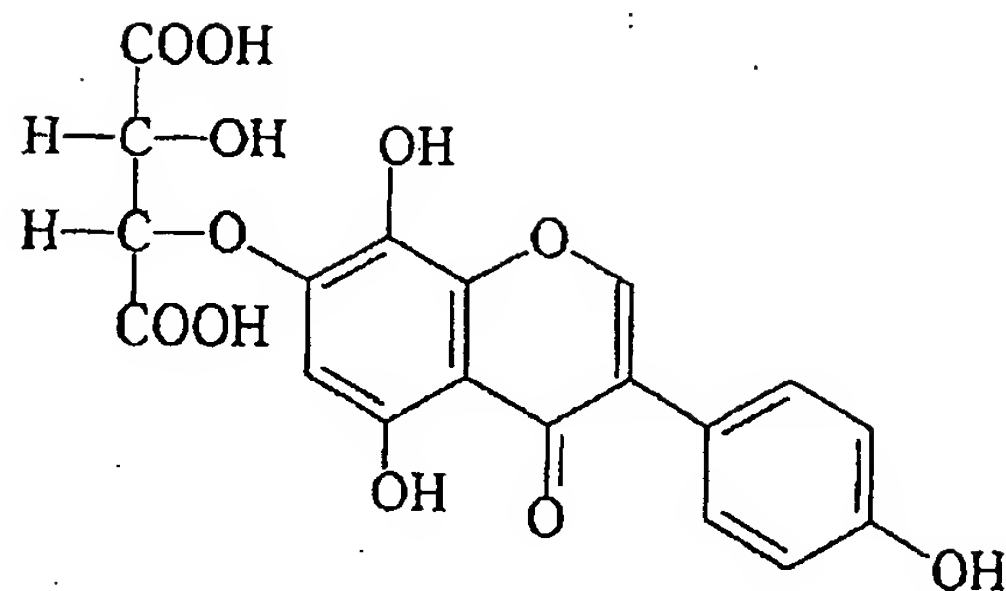
δ (ppm): 71.1, 79.7, 98.1, 105.7, 115.0, 121.1, 122.1, 126.9, 130.1, 145.1, 151.6, 152.8, 154.3, 157.4, 168.6, 171.0, 180.8

UVスペクトル: 水溶液中 265 nmに吸収

【0028】上記機器分析の結果より、ピークAは下記的一般式で表される化合物であると結論した。

【0030】

【化3】



【0031】〔実施例2〕培地にトランス-エポキシコハク酸を5g添加した以外は、実施例1と同様の条件で *Aspergillus oryzae* (IFO4206) を培養し、本物質の精製標品約4.0mgを得た。本物質の前駆物質を培地に添加することにより、培養物中への本物質の生成蓄積が促進されることが分かった。

〔試験例1〕 HDC阻害活性試験

ピークA、すなわち本物質の精製標品のHDC阻害活性を、上述の方法により調べた。結果を表1に示す。なお、対照として公知のHDC阻害物質である(+)ーカテキン [Lorenz, W., Kusche, J., Barth, H., and Mathias, C.H. (1973) in Histamine (Maslinski, C.Z. ed.) pp. 265-269, Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, Pennsylvania] を用いた。表中の「50%阻害値」とは、HDCの活性を50%とするために必要な本物質の量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を表す。

【0032】

表1

50%阻害値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
ピークA	70
(+)ーカテキン	160

【0033】表1の結果より、本物質は、(+)ーカテキンよりも強いHDC阻害活性を示すことが明らかである。

【0034】〔試験例2〕抗酸化活性試験

本物質の精製標品の抗酸化活性を、上述の方法により調べた。結果を図2に示す。図2中、縦軸は、酸化反応により生成したMeL-OOHの、HPLCによる溶出チ

ャート上でのピーク面積を示す。また、CONTROLは、反応系に抗酸化剤を加えない場合のデータを示し、sampleは、反応系に本物質を加えた場合のデータを示す。尚、ポジティブコントロールとしては、公知の抗酸化剤であるビタミンE (vitamin E) を用いた。本物質は、0.1mMで抗酸化活性を示し、0.5mMでは、0.1mMビタミンEよりも強い抗酸化活性を示した。

〔試験例3〕急性毒性試験

急性毒性試験は、「改正 医薬品毒性試験法ガイドライン GLP基準」に従い行った。本物質の精製標品50mgを、注射用蒸留水1mlに溶解し、5匹のCrj: CD-1 (ICR) マウス (5週齢、雄) に、体重25g当たり1ml (投与量 2.0g/Kg) の割合で経口投与し、14日間観察した。

【0035】試験終了後の本物質投与群は、剖検及び全身各臓器の病理組織検査において何ら異常は観察されなかった。試験の結果より、本物質のLD₅₀値は2.0g/Kg (経口) 以上であり、その毒性は極めて低いと判断された。

【0036】

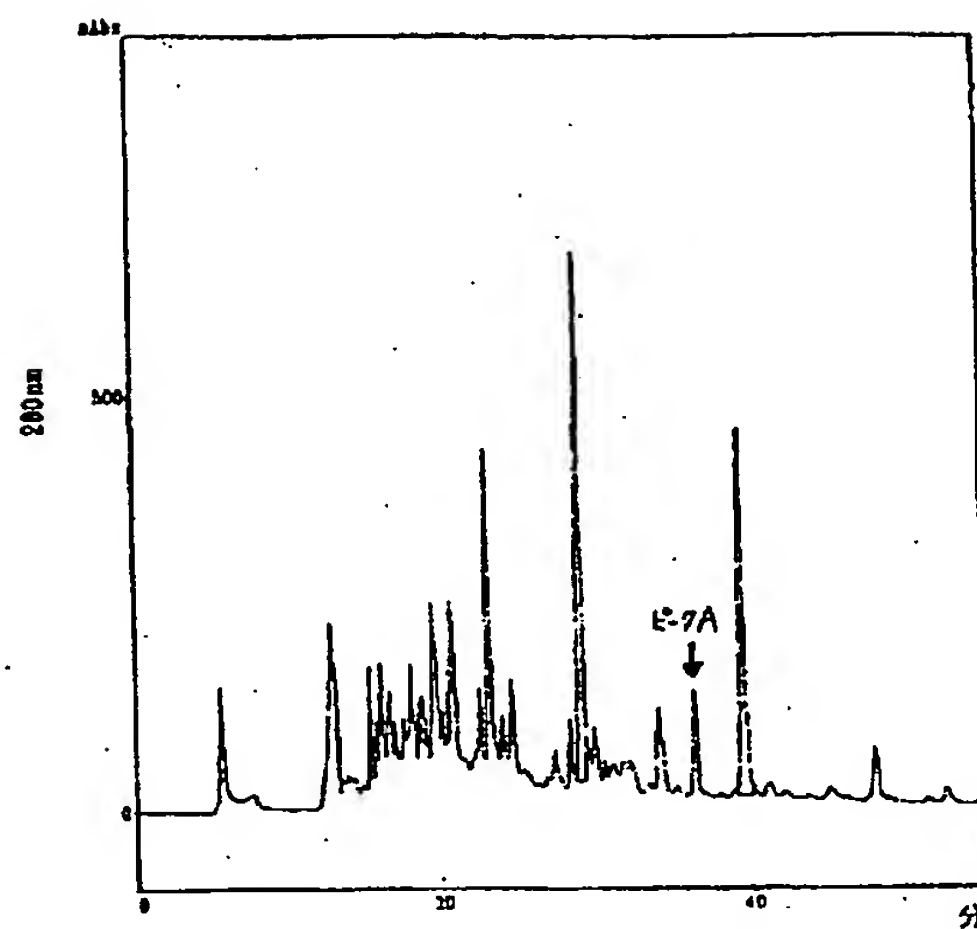
【発明の効果】本発明の新規イソフラボン誘導体は、潰瘍、アレルギー疾患等の炎症疾患の原因となるヒスタミンの生合成に関与するヒスチジン脱炭酸酵素に対し優れた活性阻害作用を示し、副作用もない。また、本物質は、優れた抗酸化活性をも有している。本物質は、医薬、抗酸化剤、機能性食品等として大変有用である。

【図面の簡単な説明】

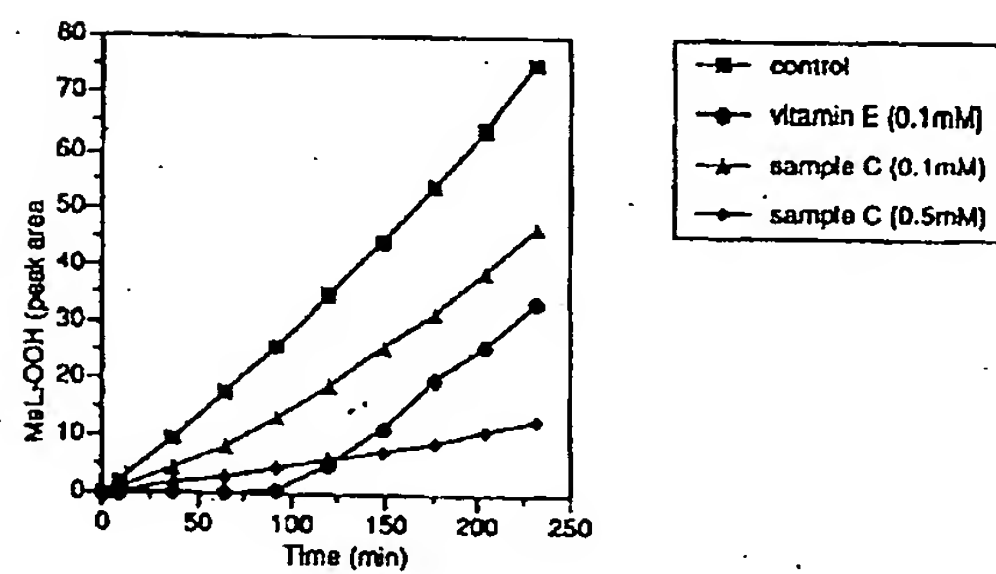
【図1】本物質の逆相HPLCによる溶出チャートを示す。

【図2】本物質の抗酸化活性試験の結果を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A 6 1 K 31/35

C 0 9 K 15/06

C 1 2 P 17/06

//(C 1 2 P 17/06

C 1 2 R 1:69)

識別記号

A E D

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 31/35

C 0 9 K 15/06

C 1 2 P 17/06

技術表示箇所

A E D